

ANTIOKSIDAN VITAMIN C DAN E MEMBERI PERLINDUNGAN TERHADAP ELASTISITAS SEL DARAH MERAH SELAMA PENYIMPANAN DARAH DONOR

Nurpuji Mumpuni¹, Francisca Romana Sri Supadmi¹, Siti Munifa Tongkasi¹,
Ahmad Fauzi¹

¹Program Studi Teknologi Bank Darah, Universitas Jenderal Achmad Yani, Yogyakarta

Submitted: Oktober 2020

Accepted: Desember 2020

Published: March 2021

ABSTRAK

Selama proses penyimpanan di bank darah, sel darah merah akan berkurang elastisitasnya, sehingga akan menurunkan kualitas darah dalam menjalankan fungsinya. Vitamin C dan vitamin E adalah antioksidan yang dapat menekan stres oksidatif dan radikal bebas. Tujuan dari penelitian ini untuk membuktikan pengaruh pemberian vitamin C dan vitamin E dalam mempertahankan elastisitas sel darah dalam darah donor yang disimpan di UTD (Unit Tranfusi Darah) dan BDRS (Bank Darah Rumah Sakit). Penelitian dilakukan dengan membuat 4 perlakuan darah donor sebagai berikut: (1) kontrol, (2) perlakuan dengan pemberian vitamin C (10.8 mmol/L), (3) perlakuan dengan pemberian vitamin E (21,34 mg/L), serta (4) perlakuan dengan pemberian kombinasi vitamin C (10.8 mmol/L) dan E (21,34 mg/L). Pengamatan dilakukan pada hari pertama minggu ke 1,2,3 dan 4, penyimpanan darah donor baik pada kelompok perlakuan maupun kontrol. Masing-masing sampel diukur jumlah sel darah merah serta kadar hemolisisnya sebelum dan sesudah sampel dilewatkan pada alat filtrasi. Preparat apus darah dan pengamatan mikroskop dibuat pada saat sebelum dan sesudah filtrasi pada minggu ke-1 dan ke-4. Analisis data dilakukan secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian vitamin C dan E sebagai antioksidan memberikan perlindungan untuk mempertahankan elastisitas sel darah merah selama penyimpanan darah donor. Pemberian kombinasi vitamin C dan E menunjukkan hasil yang lebih baik dari pada hanya pemberian vitamin C atau E saja. Proteksi vitamin C terhadap elastisitas sel darah merah lebih baik dibandingkan vitamin E.

Kata kunci: elastisitas, sel darah merah, antioksidan, vitamin C, vitamin E

ABSTRACT

During the storage process in a blood bank, red blood cells will decrease in elasticity, so that it will reduce the quality of the blood in carrying out its function. The purpose of this study was to prove the effectiveness of vitamin C and vitamin E in maintaining the elasticity of blood cells in donor blood stored in the Blood Transfusion Unit and the Hospital Blood Bank. The study was conducted by making 4 treatments of donor blood as follows: (1) control, (2) treatment with vitamin C (10.8 mmol / L), (3) treatment with vitamin E (21.34 mg / L), and (4) treatment with a combination of vitamin C (10.8 mmol / L) and E (21.34 mg / L). Observations were made on the first day of week 1,2,3 and 4. Storage of donor blood in both the treatment and control groups. The number of red blood cells and their hemolysis levels was measured in each sample before and after the sample was passed through a filtration device. Blood smear and microscopic appearance were made for each sample in week 1 and week 4, before and after filtration. Data analysis was carried out descriptively. The results showed that vitamin C and vitamin E could maintained the elasticity of red blood cells during the storage of donor blood. The combination of vitamin C and E showed better results than vitamin C or vitamin E alone. Vitamin C protection against the elasticity of red blood cells was better than vitamin E.

Keywords: elasticity, red blood cells, antioxidants, vitamin C, vitamin E

Korespondensi: nurpuji.mumpuni@gmail.com

Pendahuluan

Darah yang sudah disimpan lebih dari tiga minggu memiliki tingkat keberhasilan untuk transfusi yang sangat menurun karena elastisitas sel darah merah berkurang. Terdapat penelitian yang melihat hubungan spesifik pada komplikasi dan angka kematian setelah transfusi pasca operasi jantung dengan umur sel darah merah. Hasil penelitian mengungkapkan bahwa, penerima darah yang tua (lebih dari 14 hari) memiliki angka kematian yang jauh lebih tinggi di rumah sakit, umumnya mengalami komplikasi. Pasien yang menerima unit darah baru (kurang dari 14 hari) memiliki angka kematian yang jauh lebih rendah pada tahun pertama setelah prosedur transfusi.¹

Elastisitas sel berkurang secara signifikan seiring dengan semakin lamanya darah disimpan. Dengan menghilangnya elastisitas sel, sel-sel darah merah kurang mampu masuk ke dalam kapiler darah yang lebih kecil untuk memberikan oksigen yang sangat dibutuhkan jaringan. Jika elastisitas sel darah menghilang, maka sel tidak akan dapat kembali ke bentuk semula. Oleh karena itu, jika darah yang disimpan lebih dari tiga minggu, mungkin mengalami kekurangan elastisitas membran sel darah merah. Elastisitas

membran pada sel darah merah yang tua tidak sama dengan darah segar, meskipun memiliki lingkungan biologis dan PH serta kadar oksigen yang tepat.²

Penyimpanan darah dalam kondisi *ex vivo* menyebabkan perubahan biokimia dan biomekanikal (*storage lesion*). Salah satu alasan terbentuknya *storage lesion* adalah adanya stres oksidatif. Hal ini dibuktikan pada beberapa penelitian terdahulu tentang sel darah merah selama penyimpanan darah. Selama penyimpanan, sel darah merah mengalami perubahan struktur dan fungsi yang mengurangi viabilitas sel tersebut. Perubahan ini termasuk variasi kadar sistem antioksidan *endogenous* dan *exogenous* serta modifikasi oksidatif protein dan lipid/lemak membran sel darah merah yang mengakibatkan strukturnya menjadi tidak stabil. Banyak antioksidan yang dapat mengurangi stress oksidatif sel darah merah selama penyimpanan darah. Vitamin C terbukti dapat menetralkan radikal bebas *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan stress oksidatif pada plasma. Vitamin C juga bisa membangkitkan molekul-molekul kecil antioksidan seperti vitamin E (*α-tocopherol*), *Glutathione Sulph Hydril* (GSH) dan *β-caroten*.³

Peran suplementasi vitamin C dan vitamin E sebagai antioksidan dalam

pengelolaan klinis darah merupakan salah satu upaya pencegahan alternatif untuk menghambat penurunan elastisitas sel darah, sehingga kualitas darah donor selama proses penyimpanan tetap terjaga baik. Tujuan dari penelitian ini untuk membuktikan pengaruh pemberian vitamin C dan vitamin E dalam mempertahankan elastisitas sel darah dalam darah donor yang disimpan di Unit Tranfusi Darah (UTD) dan Bank Darah Rumah Sakit (BDRS).

Metode Penelitian

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik yang menggunakan darah donor sebagai sampel penelitian.

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama 4 (empat) bulan dimulai bulan Juni-September 2019 bertempat di Laboratorium Komponen Prodi Teknologi Bank Darah Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Sampel penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel darah dengan kriteria darah sehat yang telah dikoleksi di UTD dan

Palang Merah Indonesia (PMI) Yogyakarta. Sampel darah diambil pada hari yang sama sehingga mempunyai masa kadaluarsa yang sama. Sampel diambil secara acak sebanyak 4 kantung darah, yang diamati sampai minggu ke-4 pengamatan.

D. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah hematologi *analyzer* Sysmex XP-100, *centrifuge*, *hemoCue plasma/low Hb photometer*, *polycarbonate filtration chamber & holders*, kertas saring/*membrane polycarbonate* diameter pori 3 μ (Whatman), pompa Kangzou *Cuping Device*, tabung sampel darah 3 ml, *cuvet* 3 ml, pipet pasteur (kapiler), gelas benda, kaca penutup, mikroskop, *microtube*, *pipette tip* (20 ul dan 100 ul), dan *pipette tip* (1 ml.)

Bahan yang digunakan adalah *aquadest*, antikoagulan vitamin C sebanyak 10,8 mmol/L (1,9021 mg/L), vitamin E sebanyak 21,34 mg/L.⁴⁻⁵ Kapas, alkohol 70%, *gloves*, masker, cairan spiritus, kertas HVS, dan *logbook* penelitian.

E. Prosedur Kerja

1. Perlakuan Sampel

Penelitian dilakukan dengan membuat 4 perlakuan darah donor sebagai berikut: (1) kontrol, (2) perlakuan dengan pemberian vitamin C (10,8 mmol/L), (3) perlakuan dengan pemberian vitamin E (21,34 mg/L), serta (4) perlakuan dengan pemberian kombinasi vitamin C (10,8 mmol/L) dan E (21,34 mg/L). Pengamatan dilakukan pada hari pertama minggu ke 1, 2, 3 dan 4 penyimpanan darah donor baik pada kelompok perlakuan maupun kontrol. Penyimpanan dilakukan dengan menyimpan sampel darah dalam lemari pendingin dengan suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Masing-masing sampel diukur jumlah sel darah merah serta kadar hemolisisnya sebelum dan sesudah sampel dilewatkan pada alat filtrasi. Sebagai data pendukung pada minggu ke-1 dan ke-4 diambil data tentang profil lengkap sel darah merah dan dibuat preparat apus darah dan pengamatan mikroskopis baik sebelum dan sesudah filtrasi. Penghitungan jumlah eritrosit dan hemolisis menggunakan alat *hematology analyzer*. Elastisitas sel darah merah bisa dilihat dari banyaknya jumlah eritrosit yang lolos

melewati filtrasi membran, kadar hemolisis dan penampakan mikroskopis sel darah merah.

1. Penyimpanan Darah Donor

Selama pengamatan (sampai minggu ke-4), sampel disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ditempatkan pada bagian *holder*.

2. Proses Filtrasi

Sampel darah diencerkan 10 kali dalam larutan garam fisiologis, kemudian dilewatkan alat filtrasi melalui *membrane polycarbonate* diameter pori 3μ yang disedot dengan pompa.

3. Pemeriksaan Jumlah Sel Darah Merah, Profil lengkap Sel Darah Merah

Sampel dikeluarkan dari lemari pendingin, dihomogenkan kemudian diambil 3 cc untuk diperiksa jumlah eritrosit dan profil lengkap eritrosit menggunakan alat *hematology analyzer*.

4. Perhitungan Hemolisis

Nilai hemolisis, didapatkan dengan rumus:

$$\frac{\text{Hb Plasma} \times (1 - \text{Hct WB})}{\text{Hb WB}} \times 100\%$$

Nilai HbWB (*Haemoglobin Whole Blood*) dan HctWB (*Hematocrit Whole Blood*) didapatkan dari pemeriksaan sampel

dengan *hematology analyzer*. Hb plasma ditentukan dengan cara memutar sampel dalam *centrifuge* selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Plasma diambil ke dalam *cuve*t dan kemudian diukur menggunakan alat *HemoCue Plasma/ Low Hb Photometer*.

5. Pembuatan Preparat Apus Darah

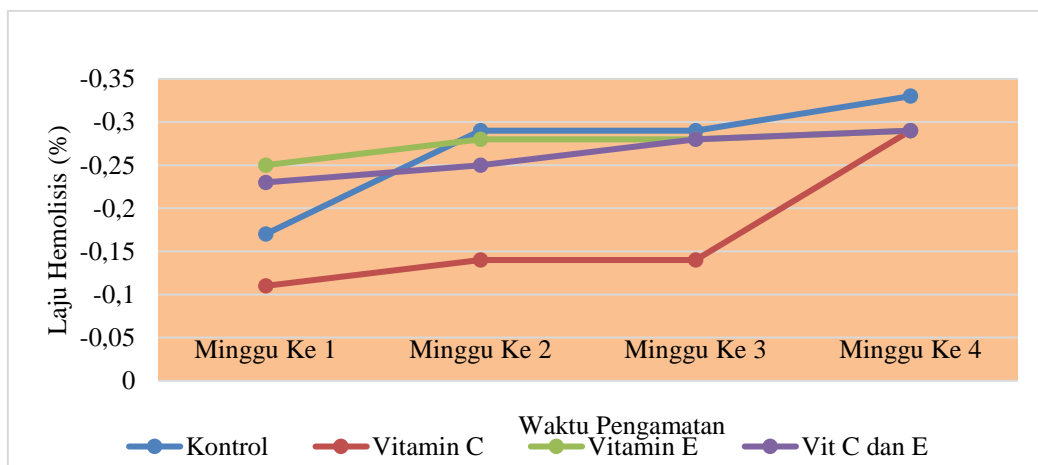
Preparat apus darah dibuat dengan pengecatan Giemsa.

2. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskripsi untuk melihat pengaruh pemberian vitamin C, vitamin E, kombinasi vitamin C dan E terhadap elastisitas sel darah merah selama penyimpanan darah donor.

Hasil Penelitian

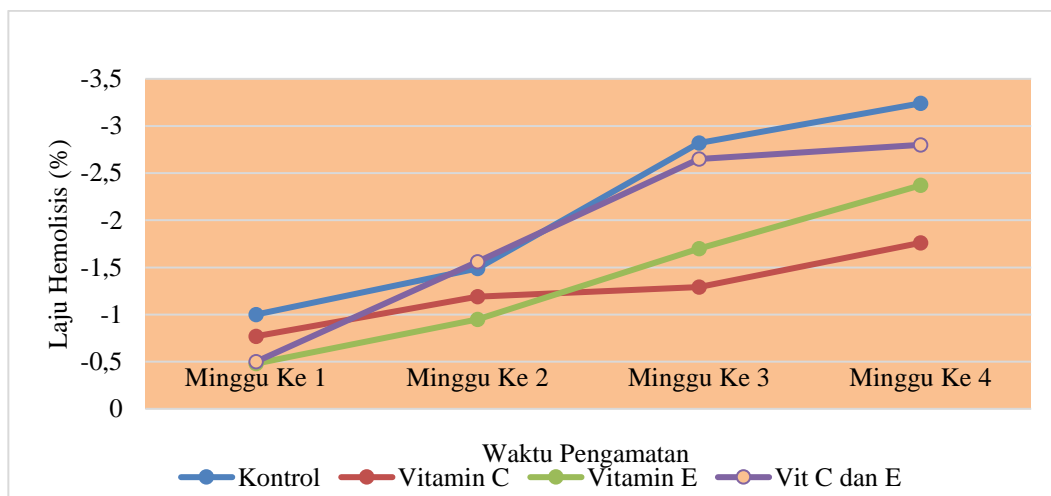
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan vitamin C, E dan kombinasi C dan E pada sampel darah mampu mempertahankan elastisitas sel darah merah selama 4 minggu pengamatan. Semua sampel darah (baik kontrol maupun yang diberi perlakuan penambahan vitamin C, E dan kombinasi vitamin C dan E) tanpa melalui filtrasi menunjukkan penurunan laju hemolisis selama 4 minggu berturut-turut (Gambar 1). Sampel darah kontrol mengalami penurunan kualitas paling tinggi ditandai dengan laju hemolisis paling tinggi. Pada akhir pengamatan perlakuan pemberian vitamin C, E dan kombinasi vitamin C dan E menunjukkan jumlah hemolisis yang sama.



Gambar 1. Jumlah Hemolisis Sampel Darah pada Semua Perlakuan Selama Penyimpanan Darah tanpa Filtrasi (Sumber: koleksi pribadi)

Peningkatan laju hemolisis yang lebih besar ditemukan pada sampel darah yang melewati membran filtrasi (Gambar 2). Sampel darah kontrol mengalami laju hemolisis yang paling besar setelah melewati filtrasi. Sementara perlakuan pemberian vitamin

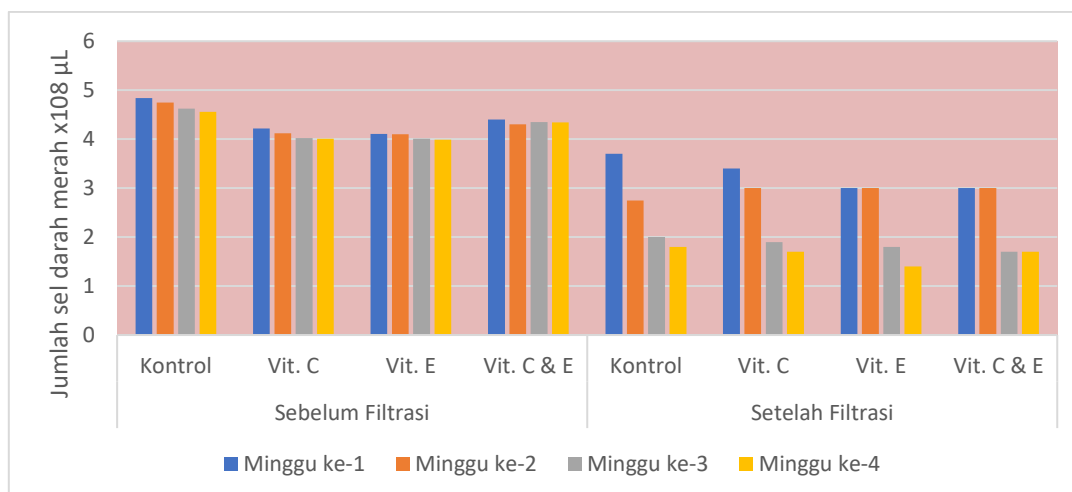
C, E atau kombinasi keduanya mengalami laju hemolisis relatif sedikit selama 4 minggu pengamatan. Perlakuan vitamin C menunjukkan tingkat hemolisis yang paling sedikit diikuti perlakuan pemberian vitamin E dan kombinasi vitamin C dan E.



Gambar 2. Jumlah Laju Hemolisis Sampel Darah pada Semua Perlakuan Selama Penyimpanan Darah Setelah melalui Fitrasi (Sumber: koleksi pribadi)

Gambar 3 menunjukkan bahwa selama proses penyimpanan darah tanpa melalui proses filtrasi sehingga dapat terjadi penurunan jumlah sel darah merah, meskipun tidak

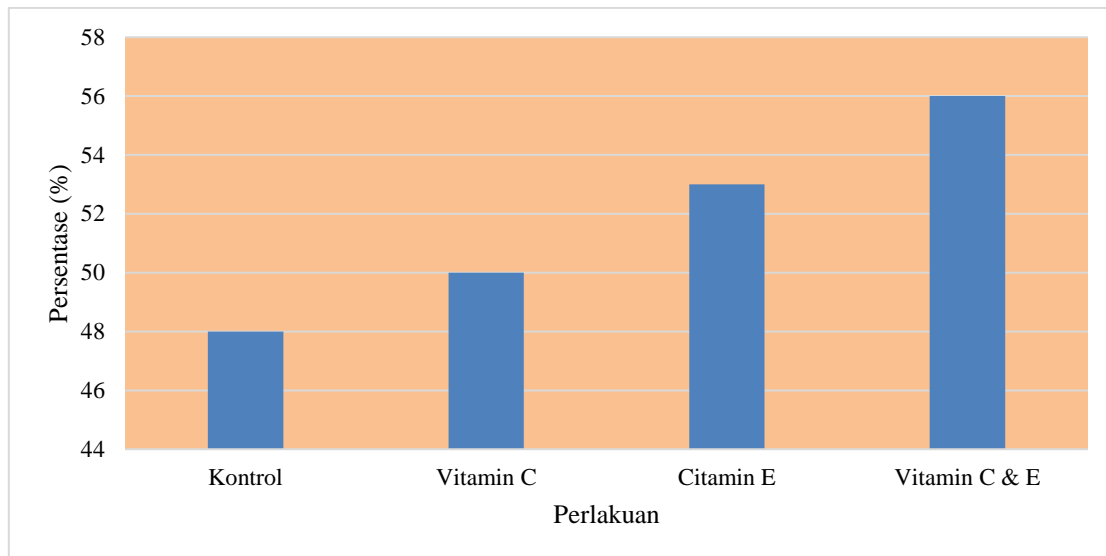
begitu tampak perbedaan. Hal ini terjadi pada semua jenis perlakuan sampel (kontrol, perlakuan vitamin C, perlakuan vitamin E dan perlakuan kombinasi vitamin C dan E).



Gambar 3. Jumlah Sel Darah Merah pada Sampel Darah pada Semua Perlakuan tanpa Filtrasi dan Setelah melalui Filtrasi (Sumber: koleksi pribadi)

Perlakuan filtrasi diberikan untuk menunjukkan tingkat elastisitas sel darah merah. Semakin baik elastisitasnya akan semakin sedikit yang lisis saat melewati filtrasi. Setelah melewati filtrasi, sebagian sel darah merah lisis, sehingga terjadi penurunan jumlah sel darah merah pada sampel. Hanya sebagian sel darah merah yang lolos melewati membran filtrasi (Gambar 3). Sel darah merah kontrol (tanpa pemberian vitamin) mengalami penurunan yang paling besar. Sementara itu, pemberian vitamin C, E dan kombinasi vitamin C dan E memberi efek protektif pada sel darah merah, elastisitasnya lebih terjaga sehingga jumlah eritrosit yang lolos filtrasi semakin banyak.

Vitamin C dan E bersifat sebagai antioksidan. Pada penelitian ini pemberian vitamin mampu memberikan perlindungan terhadap elastitas sel darah merah sehingga menurunkan persentase jumlah sel darah merah yang lisis ketika melalui membran filtrasi. Pemberian perlakuan berupa kombinasi vitamin C dan E memberi efek perlindungan terhadap elastisitas sel darah merah yang lebih baik dari pada pemberian tunggal vitamin C atau vitamin E saja, dan kontrol. Persentase sel darah merah yang lolos filtrasi di minggu terakhir paling banyak pada perlakuan pemberian kombinasi vitamin C dan E, diikuti vitamin C, kemudian vitamin E dan terakhir kontrol (Gambar 4).

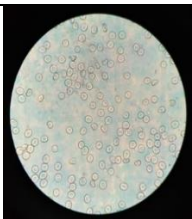

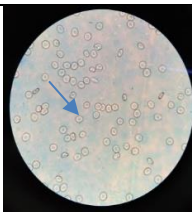
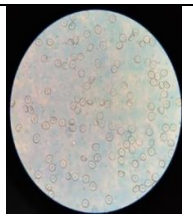
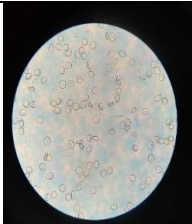
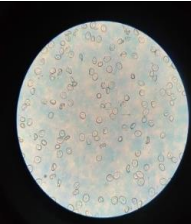
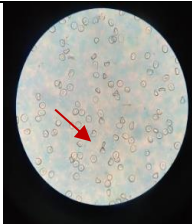
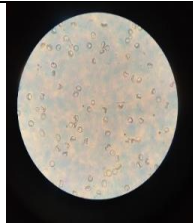


Gambar 4. Persentase Sel Darah Merah yang Lolos Filtrasi pada Akhir Penyimpanan Darah (Sumber: koleksi pribadi)

Hasil pengamatan mikroskopis pada sampel darah yang tidak melewati filtrasi menunjukkan bahwa pada minggu ke-1 di semua kelompok perlakuan tampak masih banyak sel-sel

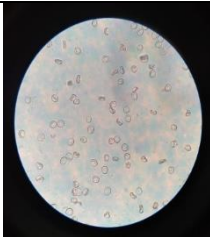
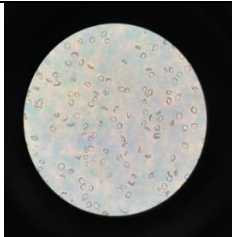
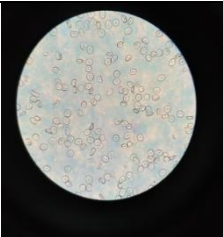
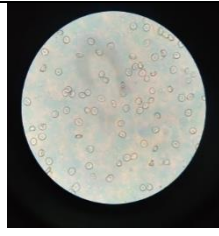
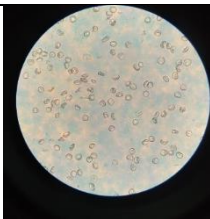
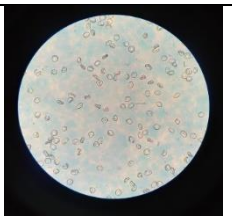
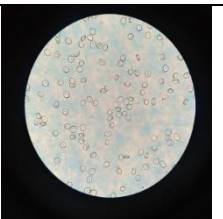
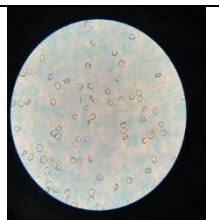
darah merah yang berbentuk utuh dalam satu bidang pandang, sedangkan pada minggu ke-4, terlihat adanya bentukan sel-sel darah merah yang sudah tidak utuh lagi (Tabel 1).

Tabel 1. Pengamatan Mikroskopis Sel Darah Merah tanpa Filtrasi (Perbesaran 40x10)

Waktu Pengamatan	KETERANGAN			
	Kontrol	Vitamin C	Vitamin E	Vitamin C dan E
Minggu Ke-1				
Minggu Ke-4				

Keterangan: Panah biru menunjukkan bentuk sel darah merah yang utuh, panah merah menunjukkan sel darah merah yang sudah tidak utuh lagi.

Tabel 2. Pengamatan Mikroskopis Sel Darah Merah Setelah Filtrasi (perbesaran 40x10)

Waktu Pengamatan	KETERANGAN			
	Kontrol	Vitamin C	Vitamin E	Vitamin C dan E
Minggu Ke-1				
Minggu Ke-4				

Hasil pengamatan mikroskopis sampel darah yang sudah melewati filtrasi, tampak bahwa sel-sel darah merah pada semua kelompok perlakuan berbentuk tidak utuh dalam satu bidang pandang, dan semakin banyak seiring bertambah lamanya waktu penyimpanan darah yaitu pada pengamatan minggu ke-4.

Pembahasan

Secara *in vivo* atau dalam tubuh manusia, sel darah berada dalam keseimbangan yang dinamis yaitu keseimbangan antara pembentukan (produksi) dan penghancuran (destruksi). Darah secara *in vitro* atau di luar tubuh seperti dalam kantung darah, tidak memiliki keseimbangan antara produksi dan destruksi karena hanya ada

destruksi tanpa ada produksi sehingga proses penghancuran terjadi lebih cepat.⁶

Selama proses penyimpanan di bank darah, sel darah merah akan mengalami serangkaian perubahan biokimiawi dan struktural yang akan mempengaruhi viabilitas dan fungsinya. Perubahan seperti ini dikenal sebagai *storage lesion*.⁷ Salah satu alasan terbentuknya *storage lesion* adalah adanya stres oksidatif.³

Stres oksidatif oleh radikal bebas dalam darah merusak membran sel darah merah. Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan, yang dipicu oleh dua kondisi umum yaitu kurangnya antioksidan dan kelebihan produksi radikal bebas.⁸ Radikal bebas merupakan

molekul yang memiliki elektron bebas. Elektron bebas ini membuat radikal bebas menjadi sangat reaktif sehingga dapat menyebabkan kerusakan sel di sekitarnya.⁹

Sebelum terjadi destruksi, sel darah merah akan kehilangan elastisitasnya seiring dengan semakin lamanya waktu simpan darah. Jika elastisitas sel darah merah berkurang, sel-sel darah merah kurang mampu masuk ke dalam kapiler yang lebih kecil untuk memberikan oksigen yang sangat dibutuhkan jaringan.⁴ Semakin berkurangnya elastisitas sel darah merah maka hemolisis semakin banyak terjadi, seperti yang ditunjukkan pada hasil pada Gambar 1. Semakin lama waktu penyimpanan darah maka akan semakin banyak sel darah merah yang mengalami hemolisis. Proses filtrasi juga menyebabkan lebih banyak sel darah merah yang lisis.

Pada penelitian ini, untuk mengetahui elastisitas sel darah merah, darah dilewatkan pada alat filtrasi dengan diameter pori membran filtrasi 3 μm , sedangkan diameter sel darah merah adalah 8 μm . Semakin elastis sel darah merah maka akan semakin mudah melawati membran filtrasi. Jumlah sel darah merah yang mampu melewati membran semakin banyak dan angka

hemolisis pun semakin kecil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian perlakuan vitamin C, vitamin E serta kombinasi vitamin C dan E bisa meningkatkan perlindungan terhadap membran sel merah dari stres oksidatif sehingga elastisitas sel darah merah dapat dipertahankan dan sel darah merah yang lisis selama melalui membran filtrasi lebih sedikit (Gambar 2) dan yang lolos melalui membran filtrasi lebih banyak (Gambar 4). Persentase terbesar jumlah sel darah merah yang berhasil melewati membran filtrasi adalah sampel darah dengan perlakuan kombinasi vitamin C dan E, kemudian diikuti oleh perlakuan vitamin C, perlakuan vitamin E dan terakhir adalah kontrol (Gambar 5).

Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa dari awal dan akhir penelitian terlihat semakin berkurangnya kepadatan sel darah merah utuh yang tampak dalam satu bidang pandang pengamatan mikroskop. Hal ini terjadi pada semua perlakuan, kontrol maupun yang mendapatkan vitamin. Pada darah yang sudah melalui proses filtrasi, lebih sedikit penampakan sel darah merah utuh jika dibandingkan pada sampel darah yang tidak melalui filtrasi. Meskipun pengamatan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40 x 10, belum dapat melihat

perbedaan morfologi detail setiap sel darah merah. Hanya terlihat bentuk sel darah merah yang utuh dan yang tidak.

Vitamin C dan E diklaim sebagai antioksidan yang berfungsi untuk mengurangi stres oksidatif dan radikal bebas ROS. Vitamin C dan E meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti *Super Oxide Dismutase* (SOD) dan GSH.⁹

Vitamin C (asam askorbat) dapat memutus reaksi radikal yang dihasilkan melalui lipoperoksida dengan bereaksi secara langsung pada fase cair dengan radikal lipid peroksida.⁹ Salah satu sifat yang membuat vitamin C sangat ideal sebagai antioksidan adalah rendahnya potensial reduksi satu elektron asam askorbat sehingga dapat dengan mudah bereaksi dengan cara mereduksi radikal-radikal bebas.¹⁰

Vitamin E (α -tokoferol) berfungsi sebagai pemelihara keseimbangan intraseluler dan sebagai antioksidan. Vitamin E dapat melindungi lemak atau asam lemak yang terdapat dalam membran sel agar tidak teroksidasi.¹¹ Vitamin E terdiri dari bagian kepala yang bersifat hidrofilik dan bagian ekor yang bersifat hidrofobik. Sifat ini memungkinkan vitamin E berada dalam membran sel. Bagian kepala vitamin E berada pada bagian yang berdekatan

dengan fosfolipid membran sel sedangkan bagian ekor menjulur ke dalam membran sel. Posisi ini sangat ideal dalam melawan oksidasi dan menghentikan reaksi berantai oksidasi lemak pada membran sel.¹⁰

Perlakuan kombinasi pemberian vitamin C dan E menunjukkan perlindungan terhadap elastisitas membran sel darah merah yang lebih baik daripada perlakuan yang lain karena vitamin C juga berfungsi sebagai generator bagi kerja vitamin E, di samping vitamin C sendiri merupakan antioksidan.³ Vitamin C dapat bertindak sebagai ko-antioksidan dengan meregenerasi radikal vitamin E (α -tokoferal).¹⁰

Simpulan dan Saran

Pemberian vitamin C dan E sebagai antioksidan terbukti berpengaruh untuk mempertahankan elastisitas sel darah merah (eritrosit) selama penyimpanan darah donor. Pemberian kombinasi vitamin C dan E menunjukkan hasil yang lebih baik daripada hanya pemberian vitamin C atau E saja. Proteksi vitamin C terhadap elastisitas sel darah merah lebih baik dibandingkan vitamin E.

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk menilai aspek klinis

pengaruh vitamin C dan E terhadap kualitas sel darah merah selama penyimpanan darah donor.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada KEMENRISTEK DIKTI yang telah membiayai penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Nancy M. Heddle, Richard J. Cook., Donald M. Arnold, Yang Liu, Rebecca Barty, Mark A. Crowther, *et al.* 2016. Effect of short-term vs. long-term blood storage on mortality after transfusion. *New Englishl Journal Medic.* 375:1937-1945.
2. Frank, Steven M. MD., Ejaz, Aslam MD, MPH., Pawlik, *et al.* 2015. Blood transfusion strategy and clinical outcomes. *Annals of Surgery.* 262 (1): p.7–8.
3. Vani, R., R. Soumya, H. Carl, V.A. Chandni, K. Neha, B. Pankhuri, *et al.* 2015. Prospect of vitamin C as an additive in plasma of stored blood. *Hindawi, Advances in Hematology.* Volume 2015.
4. Stowell, S.R., Smith, N.H., Zimring, J.C., Fu, X., Palmer, A.F., Fontes, J. *et al.* 2013. Addition of ascorbic acid solution to stored murine red blood cells increases posttransfusion recovery and decreases microparticles and alloimmunization. *Transfusion.* 53: 2248- 2257.
5. Silva, C. A. L., Azevedo Filho, C. A., Pereira, G., Silva, D. C. N., Castro, M. C. A. B., Almeida, A. F., *el al.* 2017. Vitamin E nanoemulsion activity on stored red blood cells. *Transfusion Medicine,* 27(3), doi: 10.110tme12394.
6. Ardhie. 2011. Radikal bebas dan peran antioksidan dalam mencegah penuaan. *Medicinus Scientific Journal of Pharmaceutical Development and Medical Application.* 24(1).
7. Pramesti, C.A, Arimbi, Pudji S. 2016. Pengaruh pemberian kombinasi vitamin E dan vitamin C sebagai tindakan preventif terhadap jumlah sel leydig mencit (*Mus musculus*) yang dipapar boraks. *Veterina Medika.* Vol. 9, No. 3: 1-7.
8. Doctor A dan Spinella P. 2012. Effect of processing and storage on red cell function in vivo. *Semin Perinatol* 36:248–259.
9. Rafighi, Z, Shiva, A., Arab, S and Yusuf, R.M., 2013. Association of dietary vitamine C and E intake and antioxidant enzymes in type 2 diabetes mellitus patients. *Global Journal of Health Science.*5(3): 183–187.
10. Wijaya H dan L. Junaedi. 2011. Antioksidan: mekanisme kerja dan fungsinya dalam tubuh manusia. *Journal of Agro-Based Industry.* Voume 28 No. 2: 44-45.
11. Pamungkas W. 2013. Aplikasi vitamin E dalam pakan: kebutuhan dan peranan untuk meningkatkan reproduksi, system imun dan kualitas daging pada ikan. *Media Akuakultur.* Volume 8 No 2; 156-152.